

## CONDITIONED MEDIUM DARI KULTUR PRIMER SEL SYARAF *Mus musculus*

Riris L. Puspitasari<sup>1</sup>, Arief Boediono<sup>2</sup>, Ferry Sandra<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Program Studi Biologi Universitas Al Azhar Indonesia

<sup>2</sup> Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor

<sup>3</sup> Prodia Grup

E-mail: riris.lindiawati@uai.ac.id

### ABSTRAK

Secara *in vitro*, *Embryonic Stem Cell* (ESC) dapat diarahkan perkembangannya menjadi sel neuron dan sel glia. *Conditioned medium* dari kultur primer sel syaraf mengandung sejumlah faktor pertumbuhan antara lain *nerve growth factor* (NGF), *glial derived-neurotrophic factor* (GDNF), *nestin*, dan *glial fibrillary acidic protein* (GFAP). Dengan melakukan purifikasi protein yang terkandung di dalam CM, maka diharapkan spektrum protein yang ada menjadi lebih sempit sehingga protein target dapat terdeteksi. Penelitian ini mempelajari kultur primer sel syaraf yang berasal dari hemisfer *Mus musculus*. Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan CM dari kultur primer sel syaraf *Mus musculus*. Medium yang digunakan adalah *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) *highglucose* FBS 10%. Penggantian medium kultur dilakukan setiap 2 hari sekali. Kepadatan sel sekitar  $32 \times 10^3$  sel/2 cm<sup>2</sup>. Setelah hari ke-4 terlihat adanya pertumbuhan neuron bipolar dan *neural progenitor cell* (NPC). Sel-sel astrocit akan teramati ketika periode kultur diperpanjang. Sel mengalami konfluensi setelah 12 hari kultur. Sel-sel yang tumbuh berguna untuk penjelasan neurogenesis. Kultur primer sel syaraf secara monolayer yang berasal dari hemisfer neonatus mampu mendukung pertumbuhan sel yang tergolong sebagai *neurogenic* dan *nonneurogenic*.

**Kata kunci:** kultur primer, sel syaraf, *conditioned medium*, *neural progenitor cell*, neurogenesis.

### ABSTRACT

In *in vitro* culture technique, the development of *Embryonic Stem Cell* (ESC) could be driven into neural cells and glial cells. *Conditioned medium* (CM) derived from neural primary culture might consist of important growth factors such as nerve growth factor (NGF), glial derived-neurotrophic factor (GDNF), *nestin*, and glial fibrillary acidic protein (GFAP). By doing purification of its contents, the CM surely had a purified proteins which the target protein could be identified easily. The aim of research was to obtain the CM derived from *Mus musculus* primary neural cells culture. This research used *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) *highglucose* supplemented with Fetal Bovine Serum (FBS) 10%. Medium was changed every 2 days. Cells density were  $32 \times 10^3$  cells/2 cm<sup>2</sup>. After 4 days, the growth of bipolar neuron cells and *neural progenitor cell* (NPC) would be visible. The astrocyte cells would arise if increased the culture length. The cells became confluent in 12 days. The morphology of cells growth were useful to explain the neurogenesis. Neural primary monolayer culture derived from neonatus hemispher could support neurogenic and non neurogenic cells growth.

**Key words :** primary culture, neuron, *conditioned medium*, *neural progenitor cell*, neurogenesis.

### PENDAHULUAN

*Stem cell* atau yang juga dikenal dengan istilah sel punca, merupakan sel yang dapat berproliferasi dengan mempertahankan sifat tidak terdiferensiasi. Dengan stimulasi sinyal-sinyal tertentu, *stem cell* dapat dipicu untuk berubah menjadi jenis sel yang lain. Istilah *stem cell* tidak terbatas pada sel yang berasal dari embrio. Jaringan dewasa, termasuk sumsum tulang, plasenta maupun darah tali pusat dapat menjadi sumber alternatif *stem cell*. *Stem cell* diprediksi memegang kunci untuk pengobatan beberapa penyakit yang pada saat ini tidak dapat disembuhkan dengan pengobatan konvensional, misalnya pada penyakit degeneratif seperti Alzheimer, Parkinson, diabetes dan penyakit koroner. Beberapa pengobatan yang tersedia untuk penyakit tersebut cenderung panjang dan umumnya tidak dapat menyembuhkan penyakit tersebut. Hal tersebut mendorong peneliti untuk mengusahakan kemungkinan-kemungkinan perbaikan fungsi organ secara lebih spesifik, elegan, dan tidak invasif misalnya dengan menggunakan sel punca (Atmosukarto 2005 dan Mattson *et al* 2002).

Propagasi *Embryonic Stem Cells* (ESC) untuk dapat berdiferensiasi menjadi sel tipe tertentu dipengaruhi oleh beberapa faktor yang diregulasi oleh mediator pertumbuhan yang sesuai. Secara *in*



*vitro*, ESC dapat diarahkan perkembangannya menjadi sel neuron (Zhang *et al* 2006) dan sel glia (Bouhon *et al* 2005). Bentz *et al* (2006) mengemukakan bahwa interaksi sel-sel dan kondisi lingkungan mikro dapat mempengaruhi diferensiasi ESC ataupun sel-sel prekursor baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Selain itu, Zhang *et al* (2006) menyatakan bahwa pengarahannya menggunakan *conditioned medium* (CM) juga memungkinkan dikarenakan CM dapat menyediakan faktor-faktor penginduksi neuron. CM merupakan medium yang dikoleksi dari kultur primer sel tertentu setelah dikultur selama beberapa hari. Ding dan Schultz (2004) menambahkan bahwa *stem cell fate* juga ditentukan oleh regulator intrinsik dan lingkungan ekstraseluler (*niche*). Hal tersebutlah yang mendasari penerapan metode kokultur untuk diferensiasi sel punca.

Berbagai riset telah dilakukan untuk menggali lebih dalam mengenai penggunaan CM. Dengan melakukan purifikasi protein yang terkandung di dalam CM, maka diharapkan spektrum protein yang ada menjadi lebih sempit sehingga protein target dapat terdeteksi. Salah satu metode awal untuk melakukan purifikasi protein yang terkandung dalam CM yaitu dengan melakukan pemekatan, misalnya dengan menggunakan *Centricon Plus 20* (Lin *et al* 2008 dan Sipione *et al* 2006). *Centricon Plus 20* menerapkan prinsip ultrafiltrasi, sehingga hanya protein berberat molekul > 10 kDa yang akan tertahan. Telah diketahui bahwa beberapa faktor pertumbuhan memiliki berat molekul bervariasi antara lain bFGF (17 kDa), GDNF (50 kDa), GFAP (55 kDa), NGF (130-140 kDa), dan nestin (177-220 kDa). Dengan demikian, diharapkan faktor-faktor tersebut yang tertahan setelah dilakukan proses pemekatan.

Penelitian ini berupaya mendapatkan *conditioned medium* yang berasal dari kultur primer sel syaraf *Mus musculus*. CM mengandung sejumlah *growth factor* (faktor pertumbuhan) antara lain NGF (*nerve growth factor*) (Kitazawa dan Shimizu 2005), GDNF (*glial derived-neurotrophic factor*) (Hoefen *et al* 2004 dan Yue *et al* 2006), GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) (Moghadasali *et al* 2007). Sejauh ini, penggunaan CM sebagai faktor untuk mendiferensiasikan *stem cell* umumnya dikombinasikan dengan penggunaan *growth factor* antara lain bFGF (*basic fibroblast growth factor*) (Moghadasali *et al* 2007) dan EGF (*epidermal growth factor*) (Zhang *et al* 2006). Oleh sebab itu perlu adanya studi yang mengkaji metode alternatif untuk mendapatkan CM dari kultur primer syaraf.

Pada otak mamalia terdapat beberapa sub tipe sel teridentifikasi berada di area SVZ dan memiliki peranan tertentu (Doetsch *et al* 1997). Sub tipe *astrocyte-like cells* atau *stem cells* tipe B memberikan ekspresi positif terhadap penanda GFAP. Sel glia radial mampu berdiferensiasi menjadi *neural precursor cells* (NPC). *Neural stem cells* (NSC) membelah secara asimetris menghasilkan *astrocyte-like cells* dan sel prekursor (Tipe C). Selanjutnya sejumlah sel tipe B dan tipe C membentuk semacam saluran sehingga *neuroblast* bermigrasi menuju *sub ventricular zone*. *Neuroblast* yang bermigrasi merupakan hasil diferensiasi sel tipe C dan dinamakan sel tipe A. *Neuroblast* membelah hingga terintegrasi sebagai sel granular di area OB. Sementara itu, sel-sel neuron yang matur mengisi area korteks. Selanjutnya *stem cells* di lapisan sub granular menghasilkan sejumlah sel prekursor. Kemudian *neuroblast* bermigrasi menuju lapisan sel granular dan memiliki dendrit di lapisan molekuler (Cleary *et al* 2006). Dengan demikian, pertumbuhan dan perkembangan NSC melibatkan serangkaian tahapan mulai dari pembelahan, diferensiasi, migrasi, dan maturasi.

*Neural Stem Cells* (NSCs), populasi sel dengan karakter multipoten, ternyata memegang peranan penting. Selama perkembangan otak, NSC mampu berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel yang krusial bagi fungsi organ otak. Neurogenesis pada mamalia diawali dengan pembentukan neuroektoderm yang akan berkembang menjadi *neural plate* pada usia embrio 7.5 hari (pada mencit). Sebagai kelanjutannya, maka akan terjadi pelipatan secara invaginasi sehingga terbentuk *neural tube* pada embrio berusia 8.5 hari. Pembentukan sel-sel syaraf akan terus berlanjut hingga fetus dilahirkan. Dengan demikian untuk merunut faktor-faktor molekuler yang terlibat pada proses formasi otak secara *in vivo* tersebut, maka dibutuhkan suatu penanda yang mampu memvisualisasikan proses tersebut, salah satunya nestin. Nestin merupakan protein yang dihasilkan oleh NSC, *Neural Progenitor Cells*, sel glia, sel astrosit, dan sel *neuron*. Gen *nestin* terekspresi pada berbagai tahap perkembangan otak mamalia mulai dari usia embrio 5.5 hari hingga fetus dilahirkan (neonatal). Pada individu dewasa, neurogenesis akan mengalami penurunan seiring dengan transisi proses seluler dan molekuler termasuk juga ekspresi *nestin*. Apabila keadaan tersebut dikaitkan dengan penyebab penyakit neurodegeneratif, maka *nestin* dapat dijadikan penanda dalam penelusuran bagian-bagian dari otak



pada mencit yang mengekspresikannya. Dengan demikian dapat diketahui ketersebaran ekspresi *nestin* bila dihubungkan dengan tahap perkembangan otak mencit setelah fetus dilahirkan (neonatal) hingga usia dewasa (*adult*) (Conti *et al.* 2005).

Pada perkembangan embrio mencit, 3 hari pasca fertilisasi, embrio atau blastosis akan terbentuk 3 macam jaringan yaitu epiblast, trofektoderm, dan endoderm primitif. Ketiga macam jaringan tersebut merupakan hasil perkembangan dari sel-sel blastosis yaitu embrionik, trofoblast, dan ekstra embrionik stem cell. Dengan faktor induksi yang tepat dan cell fate yang dimiliki maka sel-sel tersebut mampu berperan sebagai faktor penting untuk perkembangan jaringan selanjutnya. Dengan mempelajari morfologi, ekspresi faktor transkripsi, dan kebutuhan faktor tumbuh tertentu maka dapat diketahui cell fate dari tiap tahap perkembangan dengan basis molekular. *Neural stem cell* (NSC) endogen dapat teraktifkan akibat adanya beberapa stimulan. Sinyal penginduksi tersebut dapat berupa adanya respon akibat trauma atau penyakit sehingga memicu dihasilkannya sel prekursor neuron, sel neuron dan sel glia (Kaneko *et al.* 2011).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan CM dari kultur primer sel syaraf *Mus musculus*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menyumbangkan informasi mengenai pengembangan metode mendapatkan CM dari kultur primer sel syaraf *Mus musculus*. Selain itu juga bermanfaat bagi aplikasi medium kultur pada kultur diferensiasi *stemcell*.

## METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor (IPB), Bogor dan Stem Cell and Cancer Institute (SCI), Jakarta. Penelitian dilakukan pada 2009. Penelitian terbagi atas tahap kultur primer sel syaraf dan pembuatan *Conditioned Medium* (CM). Data yang diperoleh berupa data pertumbuhan sel syaraf dalam kultur yang dibahas secara deskriptif.

Kultur primer sel syaraf dilakukan sesuai petunjuk dari Bentz *et al* (2006) dan Zhang *et al* (2006) dengan sedikit modifikasi. Bagian hemisfer mencit usia 2 hari diisolasi dalam larutan *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) (Gibco, USA) yang mengandung  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,89 mM (Merck),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,49 mM (Merck), *Penicillin* 50 U/ml, *Streptomycin* 50 mg/ml (Sigma, USA), dan *fetal bovine serum* (FBS) (Gibco, USA) 1%. Kemudian dengan menggunakan pipet Pasteur didapatkan suspensi sel. Suspensi sel dibiarkan mengendap selama 1 menit, kemudian supernatan ditampung ke dalam tabung dan disentrifus dengan kecepatan 200 g selama 1 menit. Setelah pelet didapat, kemudian sel dikultur. Medium kultur yang digunakan adalah *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) *highglucose* (Sigma, USA) yang telah ditambahkan *nonessential amino acids* (NEAA) 1% (Sigma, USA), *Penicillin* 50 U/ml, *Streptomycin* 50 mg/ml,  $\beta$ -mercaptoethanol 0,1 mM (Sigma, USA), dan FBS 10%. Sel dikultur dengan kepadatan  $32 \times 10^3$  sel/ $2 \text{ cm}^2$ , dalam *culture flask*  $12,5 \text{ cm}^2$  (BD, USA) dan diinkubasi pada  $37^\circ\text{C}$ ; 5%  $\text{CO}_2$ . Medium kultur diganti setiap 2 hari. Berdasarkan penelitian pendahuluan, setelah hari ke-4 akan terlihat adanya pertumbuhan neuron bipolar dan *neural progenitor cell* (NPC). Selain itu, juga terlihat adanya pertumbuhan sel-sel fibroblas. Kemudian sel-sel astrosit akan teramati ketika periode kultur diperpanjang. Sel akan mengalami konfluensi setelah 12 hari kultur.

Pembuatan CM yang dikonsentratkan dan pengukuran konsentrasinya dilakukan menurut petunjuk Sandra F *et al* (2005). Pada hari ke-8, medium kultur primer saraf diganti dengan medium kultur tanpa penambahan FBS dan diinkubasi. Setelah 48 jam, medium dikoleksi dari tiap *flask* untuk kemudian dikonsentratkan dan dilakukan pengukuran konsentrasi protein. Medium yang telah dikoleksi kemudian ditampung dan dikonsentratkan hingga 5X dengan menggunakan *Centricon Plus 20* (10K NMWL, UFC2 LGC02, Milipore, USA), untuk selanjutnya disentrifus pada 4000 g;  $4^\circ\text{C}$  selama 10 menit. Dengan tipe membran *Centricon Plus 20* yaitu 10K *nominal molecular weight limit* (NMWL), maka protein yang tertahan memiliki berat molekul lebih dari 10 kDa, yang kemudian akan diukur konsentrasinya. Konsentrasi protein diukur baik terhadap CM yang dikonsentratkan maupun yang tidak. Pengukuran konsentrasi dilakukan dengan menggunakan *Quick Start Bradford Protein Assay* (500-0201, Bio-Rad, USA). Selanjutnya, pembacaan nilai absorbansi dari larutan standar dan 2 macam sampel CM dilakukan dengan menggunakan *Microplate Reader* pada  $\lambda = 595 \text{ nm}$ , sehingga didapatkan konsentrasi proteinnya adalah 490  $\mu\text{g/ml}$  (untuk 1XCM) dan 2615  $\mu\text{g/ml}$  (untuk 5XCM). Kedua macam CM yang telah dikoleksi disimpan pada suhu  $-80^\circ\text{C}$ .





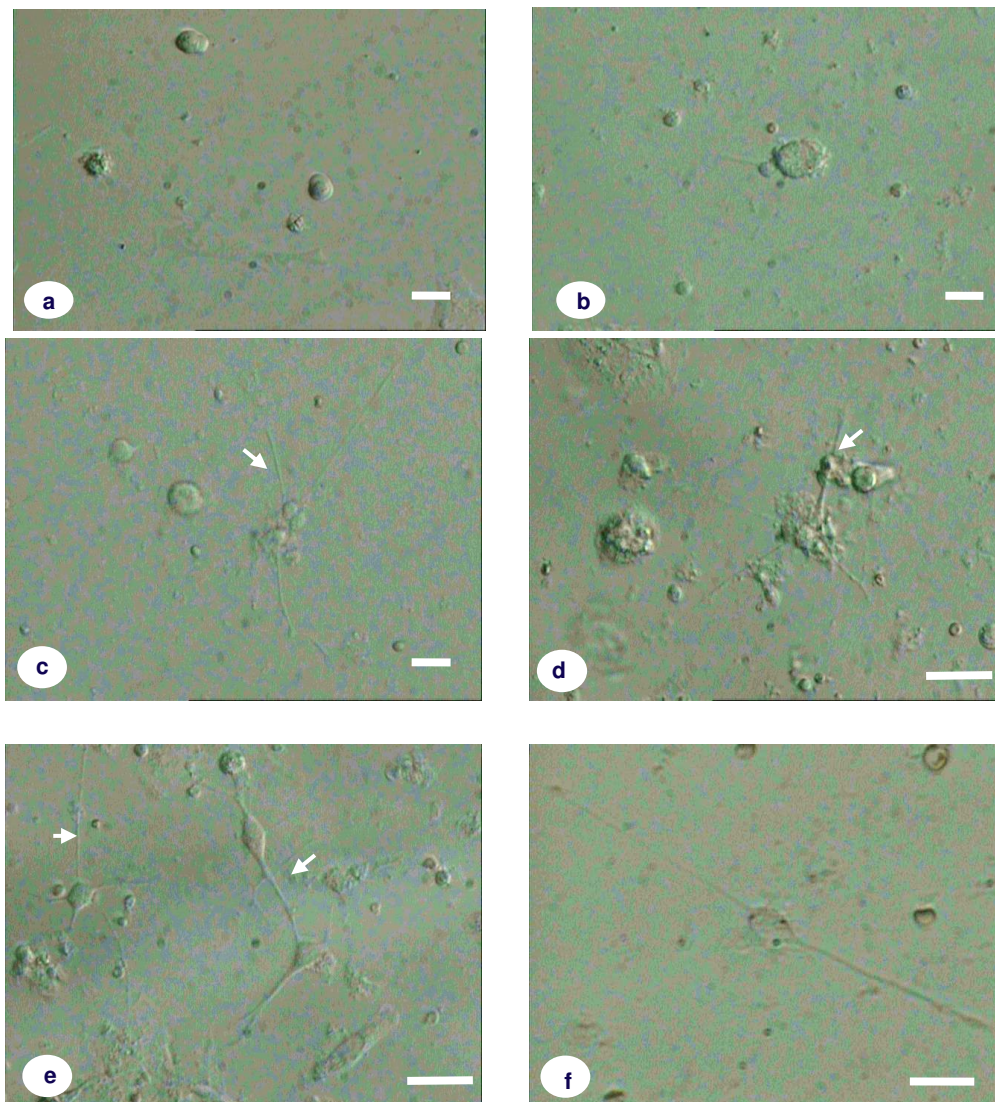
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan studi awal bagi metode alternatif kultur diferensiasi ESC mencit menjadi sel neuron secara *in vitro*, yang akan digunakan untuk kepentingan penelitian yang pada akhirnya akan bermuara untuk kepentingan terapi degeneratif.

### Kultur Primer Sel Syaraf

Kultur primer sel syaraf digunakan sebagai sumber untuk mendapatkan *conditioned medium*. Sumber eksplan yang digunakan adalah jaringan hemisfer mencit yang berusia 2 hari. Jaringan otak dari fetus tersebut merupakan sumber dari berbagai tipe sel syaraf yang memiliki karakter multipoten, sehingga diharapkan porsi sel-sel progenitor masih tinggi. Dengan menggunakan metode *monolayer*, maka selain pertumbuhan dari sel-sel *neurogenic* juga terlihat perkembangan dari sel-sel *non neurogenic* seperti sel fibroblas (Walton *et al* 2006).

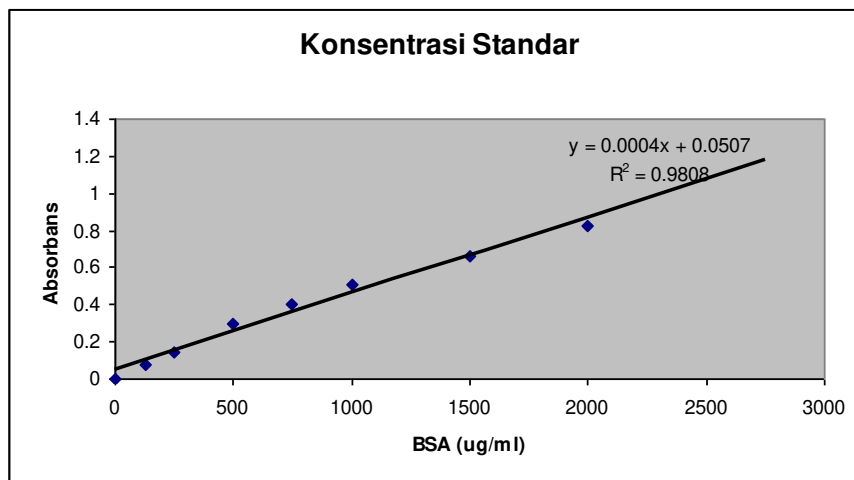
Selama penelitian, karakter dari kultur primer sel syaraf yang teramati adalah sel-sel tunggal cenderung membentuk 'kaki-kaki' ketika melekat ke dasar petri setelah 24 jam. Pada beberapa hari kemudian akan terlihat adanya pertumbuhan neurit sebagai ciri khas dari sel neuron dan terkadang membentuk koneksi antar neurit dari sel yang lain. Untuk menentukan dengan pasti tipe sel yang berkembang pada kultur primer sel syaraf dapat dikonfirmasi dengan uji imunohistokimia, namun saat penelitian metode ini tidak dilakukan. Sementara itu, ketika dilakukan tripsinasi untuk subkultur ternyata viabilitas sel menjadi turun dan sel-sel yang tumbuh memiliki morfologi yang abnormal. Berikut merupakan gambaran dari perkembangan sel-sel syaraf selama kultur.



Gambar 1 Perkembangan sel syaraf dalam kultur setelah: (a) 24 jam, (b) 2hari, (c) 4 hari, (d) 6 hari, (e, f) 8 hari. Panah: menunjukkan neurit. Skala bar 5  $\mu\text{m}$  (a, b, c); 9  $\mu\text{m}$  (d, e); 8  $\mu\text{m}$  (f).

### Conditioned Medium

*Conditioned medium* adalah medium kultur yang telah digunakan sebagian oleh suatu sel. CM mengandung sejumlah faktor yang disekresikan oleh kultur sel tersebut. Faktor-faktor tersebut diyakini dapat mendukung pertumbuhan dan perkembangan sel yang dikultur (Xu *et al* 2005). Pada umumnya, CM digunakan dengan mencampurnya dengan *fresh medium* kultur. Beberapa riset melakukan purifikasi terhadap faktor-faktor yang terkandung di dalam CM, dengan maksud agar didapatkan spektrum protein yang mengandung protein target. Telah diketahui sebelumnya bahwa CM yang berasal dari kultur primer sel syaraf mengandung sejumlah komponen penting seperti *growth factor* (faktor pertumbuhan) antara lain NGF (*nerve growth factor*), GDNF (*glial derived-neurotrophic factor*), nestin dan GFAP (*glial fibrillary acidic protein*). Berikut merupakan hasil pengukuran konsentrasi CM dengan *Biorad Protein Assay*.



Dengan memasukkan nilai absorbansi kedua macam CM yaitu 1,469 (5XCM) dan 0,619 (1XCM) pada persamaan tersebut, maka didapat nilai konsentrasinya adalah 2615 µg/ml (untuk 5XCM) dan 490 µg/ml (untuk 1XCM).

*Conditioned medium* yang dikoleksi dari kultur primer setelah inkubasi selama 48 jam, kemudian dilakukan proses pemekatan menggunakan *Centricon Plus 20*. *Centricon Plus 20* menerapkan prinsip ultrafiltrasi yang akan menyebabkan hanya protein berberat molekul > 10 kDa yang tertahan. Selanjutnya dilakukan pengukuran konsentrasi terhadap konsentrat hasil pemekatan dan CM tanpa pemekatan. Hasilnya adalah 2615 µg/ml (untuk 5XCM) dan 490 µg/ml (untuk 1XCM). 5XCM merupakan CM hasil pemekatan sedangkan 1XCM merupakan CM tanpa pemekatan. Dengan kata lain, 5XCM mengandung sejumlah *concentrated protein* dengan berat molekul > 10 kDa yang berkontribusi penting bagi diferensiasi ESC mencit menjadi sel neuron. Sedangkan 1XCM merupakan CM yang mengandung sejumlah *crude protein*.

### KESIMPULAN DAN SARAN

Kultur primer sel syaraf *Mus musculus* secara monolayer memberikan pertumbuhan beberapa tipe sel dengan karakteristik memiliki neurit. Kultur primer sel syaraf yang bersumber dari hemisfer neonatus memberikan pertumbuhan sel yang tergolong sebagai *neurogenic* dan *nonneurogenic*.

Perlu adanya uji imunohistokimia untuk mengkonfirmasi tipe sel yang berkembang pada kultur primer sel syaraf. Identifikasi kandungan protein dalam *conditioned medium* dengan menggunakan teknik yang lebih spesifik. Selain itu perlu dilakukan penambahan periode kultur agar terlihat adanya pertumbuhan tipe sel neuron yang lain.



## DAFTAR PUSTAKA

- Atmosukarto I. 2005. *Penelitian berbasis stem cell: Harapan dan kontroversinya*. *Biotrends*.1:11-16.
- Bentz K, Molcanyi M, Heb S, Schneider A, *et al*. 2006. *Neural differentiation of embryonic stem cells is induced by signaling from non-neural niche cells*. *Cell Physiol. Biochem*.18:275-286.
- Bouhon IA, Kato H, Chandran S, Allen N. 2005. *Neural differentiation of mouse embryonic stem cells in chemically defined medium*. *Brain Res. Bull*. 68:62-75.
- Cleary MA, Uboha N, Picciotto MR, Beech RD. 2006. Expression of ezrin in glial tubes in adult subventricular zone and rostral migratory stream. *J. Neurosci*. 143:851-861.
- Conti L, Pollard SM, Gorba T, Reitano E, *et al*. 2005. Niche independent symmetrical self renewal of a mammalian tissue stem cell. *Plos Biol*. 3:283-296.
- Ding S, Schultz PG. 2004. A role for chemistry in stem cell biology. *Nat. Biotechnol*. 22:833-840.
- Doetsch F, Verdugo G, Buyla JM. 1997. Cellular composition and three dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci*. 17:5046-5061.
- Hoefen B, Alvarez E, Freed CR. 2004. Generation of tyrosine hydroxylase positive neurons from human embryonic stem cells after coculture with cellular substrate and exposure to GDNF. *StemCells*. 22:669-674.
- Kaneko N, Kako E, Sawamoto K. 2011. Prospects and limitations of using endogenous neural stem cells for brain regeneration. *Genes* 2:107-30.
- Kitazawa A, Shimizu N. 2005. Differentiation of mouse embryonic stem cells into neurons using conditioned medium of dorsal root ganglia. *J. Biosci. Bioeng*. 100:94-99.
- Lin SH, Cheng CH, Lee YC, Tsai WW, *et al*. 2008. A 45 kDa ErbB3 secreted by prostate cancer cells promotes bone formation. *Oncogene*. 27:5195-5203.
- Mattson MP, Chan SL, Duan W. 2002. Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet and behavior. *Physiol. Rev*. 82:637-672.
- Moghadasali R, Zeynali, B, Soleimani M, Hatami M, *et al*. 2007. Effect of astrocyte conditioned medium, retinoic acid and basic fibroblast growth factor on neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *YakhtehMedicalJournal*. 9:176-183.
- Sandra F, Hendarmin L, Kukita T, Nakao Y, *et al*. 2005. Ameloblastoma induces osteoclastogenesis: a possible role of ameloblastoma in expanding in the bone. *OralOncol*. 41:637-644.
- Sipione S, Simmen KC, Lord SJ, Motyka B, *et al*. 2006. Identification of a novel human granzyme B inhibitor secreted by culture sertoli cells. *J. Immunol*. 177:5051-58.
- Sunabori T, Tokunaga A, Nagai T, Sawamoto K, *et al*. 2008. Cell-cycle-specific nestin expression coordinates with morphological changes in embryonic cortical neural progenitors. *J. Cell Sci*. 121:1204-1212.
- Walton NW, Sutter BM, Chen HX, Chang LJ, *et al*. 2006. Derivation and large-scale expansion of multipotent astroglial neural progenitors from adult human brain. *Dev*. 133:3671-3681.
- Xu C, Rosler E, Jiang J, Lebkowski JS, *et al*. 2005. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cells growth without conditioned medium. *Stem Cells*. 23:315-323.
- Zhang JQ, Yu BY, Ma BF, Yu WH, *et al*. 2006. Neural differentiation of embryonic stem cells induced by conditioned medium from neural stem cell. *Neuroreport*. 17:981-986.

